NUMERISCHE UND STRUKTURELLE CHROMOSOMEN-VERÄNDERUNGEN IN EINER LANGZEITKULTUR VON WEIBLICHEN MICROTUS AGRESTIS – FIBROBLASTEN

INAUGURAL–DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von

BEN–ZION AMSTER
aus Tel Aviv / Israel

BONN 1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546506_0057

NUMERISCHE UND STRUKTURELLE CHROMOSOMEN-VERÄNDERUNGEN IN EINER LANGZEITKULTUR VON WEIBLICHEN MICROTUS AGRESTIS – FIBROBLASTEN

INAUGURAL–DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von

BEN–ZION AMSTER
aus Tel Aviv / Israel

BONN 1980

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. F. Pera
2. Gutachter: Prof.Dr.G.Schwanitz

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Bonn

Direktoren: Prof. Dr. K. Fleischhauer
Prof. Dr. H. Wartenberg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Druck: M. Wehle, 5305 Witterschlick

meinen Eltern und Großeltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
EINLEITUNG		5
MATERIAL UND METHODEN		7
1.	Zellkultur	7
2.	Chromosomenpräparation	7
3.	Markierung mit 5-Bromdesoxyuridin (BrdU)	7
ERGEBNISSE		9
1.	Zahl der Chromosomen zu verschiedenen Kulturzeiten	9
2.	Struktur der Chromosomen zu verschiedenen Kulturzeiten	12
2.1.	Markerchromosomen	12
2.2.	Einleitung, Vorkommen und Häufigkeit der Markerchromosomen	13
2.3.	BrdU-Markierung der Markerchromosomen	23
2.4.	Sonstige Markerchromosomen	24
DISKUSSION		28
1.	Heterochromatin	28
1.1.	Fakultatives Heterochromatin	29
1.2.	Konstitutives Heterochromatin	30
1.3.	Molekularer Aufbau des Heterochromatins	31
1.3.1.	Repetitive DNS	31
1.3.2.	Unterschiede in der Basenzusammensetzung der DNS	32
1.3.3.	Unterschiede in der Proteinzusammensetzung	33
1.3.4.	Verpackungsunterschiede der DNS	33
1.4.	Genetische Aktivität des Heterochromatins	34
1.5.	Funktion des konstitutiven Heterochromatins	35
2.	Zeichen der Entartung der Zellen	37
2.1.	Numerische Aberrationen	37
2.2.	Morphologische Aberrationen	38
3.	Zellentartung und Heterochromatisierung	40
ZUSAMMENFASSUNG		43
LITERATUR		44
DANKSAGUNG		57
LEBENSLAUF		58

EINLEITUNG

Bei der Erdmaus (Microtus agrestis) ist der größte Teil des konstitutiven Heterochromatins auf den beiden Geschlechtschromosomen lokalisiert: das proximale Viertel des kurzen Armes und der ganze lange Arm der X-Chromosomen und fast das gesamte Y-Chromosom sind konstitutiv heterochromatisch. Die Autosomen besitzen nur in den Centromerregionen kleine heterochromatische Segmente. Der restliche Teil der kurzen Arme des X_1-Chromosoms besteht aus Euchromatin, der des X_2-Chromosoms aus fakultativem Heterochromatin (Wolf, Flinspach, Böhm, Ohno, 1965; Schmid, Smith, Theiler, 1965; Arrighi, Hsu, Saunders, Saunders, 1970). Da das konstitutive Heterochromatin somit in großen, zusammenhängenden Blöcken auf nur wenigen Chromosomen lokalisiert ist, können mögliche Veränderungen dieses Chromosomenmaterials leicht erkannt werden. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden in vitro und in vivo Untersuchungen über numerische und morphologische Chromosomenveränderungen bei M. agrestis durchgeführt (Schneider und Waldenmaier, 1969; Pera 1969$_b$; Cooper und Hsu, 1971; Natarajan und Ahnström, 1973; Firsching, 1976; Cooper, 1977). Neben mehr oder weniger auffälligen autosomalen Aberrationen konnten in all diesen Untersuchungen Deletionen und Translokationen von konstitutivem Heterochromatin beobachtet werden. Die Lebens- und Vermehrungsfähigkeit der Zellen blieb trotzdem erhalten. Die angeführten Untersuchungen erstreckten sich jedoch auf Beobachtungszeiten von weniger als einem Jahr.

In dieser Arbeit wird über Karyotypanalysen einer weiblichen M. agrestis-Kultur berichtet, die fast 4,5 Jahre in vitro gehalten und vermehrt werden konnte. Hierbei interessierte besonders die Beantwortung folgender Fragen:

1. Welche morphologischen und numerischen Aberrationen traten während der Kulturdauer auf?

2. Ist die Lebens- und Vermehrungsfähigkeit der Zellen durch die chromosomalen Veränderungen beeinträchtigt oder begrenzt worden?

3. Welche Funktionen erfüllt das konstitutive Heterochromatin, und welche Zusammenhänge gibt es zwischen Veränderungen des Heterochromatins und einer Entartung der Zellen?

MATERIAL UND METHODEN

1. Zellkultur

Einer weiblichen Erdmaus (Tötung mit Äther) wurden steril die Lungen entnommen und zerkleinert. Nach Spülung in Hanks-Lösung und Trypsinbehandlung (0.25 %, 37 °C, 15 Minuten) wurden die Stückchen auf dem Boden von Vierkantflaschen 2h angetrocknet und dann mit 10 ml Kulturmedium (MEM Eagle mit 20 % fetalem Kälberserum, Glutamin, Penicillin-Streptomycin und Phenolrot) überschichtet. Zur Herstellung von Subkulturen wurden die Zellen mit 0,25 %igem Trypsin suspendiert, zentrifugiert und mit frischem Medium versetzt auf Vierkantflaschen übertragen. Zur Trypsininaktivierung wurden nach Abschluß der Behandlung jeweils 20 Volumenteile Kälberserum zugegeben.

2. Chromosomenpräparation

Zwei Tage nach Ansetzen wurden die Zellen mit Colcemid 1 : 100 (0.3 ml auf 10 ml Medium) 2h bei 37 °C behandelt. Die mit Trypsin (s. o.) abgelösten und dann zentrifugierten Zellen wurden hypotonisch behandelt (0.563 %ige KCl-Lösung, 5 Minuten, bei 37 °C) und 5 Minuten bei 1.000 U/min zentrifugiert. Die Fixierung erfolgte durch Zugabe von Methanol-Essigsäure 3 + 1 (30 Minuten bei 4 °C), anschließend wurde zentrifugiert (5 Minuten, 1.000 U/min). Dieser Vorgang wurde dreimal durchgeführt. Das Sediment wurde mit wenig Fixierungslösung aufgeschwemmt, auf gereinigte, in Eiswasser gekühlte Objektträger aufgetropft und luftgetrocknet. Die Präparate wurden mit Giemsa (s. u.) oder Diamantfuchsin (1nHCl, 60 °C, 8 Minuten; 0,1 %ige Diamantfuchsin-Lösung 5 Minuten; Spülen in Aqua-Dest, Lufttrocknen) gefärbt und mit De Pe X eingedeckt.

3. Markierung mit 5-Bromdesoxyuridin (BrdU)

Zur Darstellung des Spätreplikationsmusters der Chromosomen und zum Nachweis des spätreplizierenden konstitutiven Heterochromatins wurden die Zellen 5h mit BrdU (20 µg/ml Medium) behandelt, davon die letzten 3 h in Gegenwart von Colcemid (s. o.). Die von diesen Zellen hergestellten Chromosomenpräparate wurden etwas

modifiziert nach der von Perry und Wolff (1974) angegebenen Fluoreszenz-plus-Giemsa-Technik gefärbt: 1nHCl, 20 °C, 2 Minuten; Spülung in Leitungswasser, 5 Minuten; Phosphatpuffer nach Sörensen pH 6.8, 5 Minuten; Fluorochromierung mit Hoechst 33258, 0.5 µg/ml Phosphatpuffer, pH 6,8, 10 Minuten; UV-Bestrahlung unter Phosphatpuffer, 10 cm Abstand, ca. 1.500 µw/cm², 20 Minuten; 2 x SSC, 62 °C, 2 h; Spülung in Phosphatpuffer; Giemsafärbung (10 % der Standardlösung in Phosphatpuffer, ca. 20 Minuten); Spülung in Phosphatpuffer, Lufttrocknen.

ERGEBNISSE

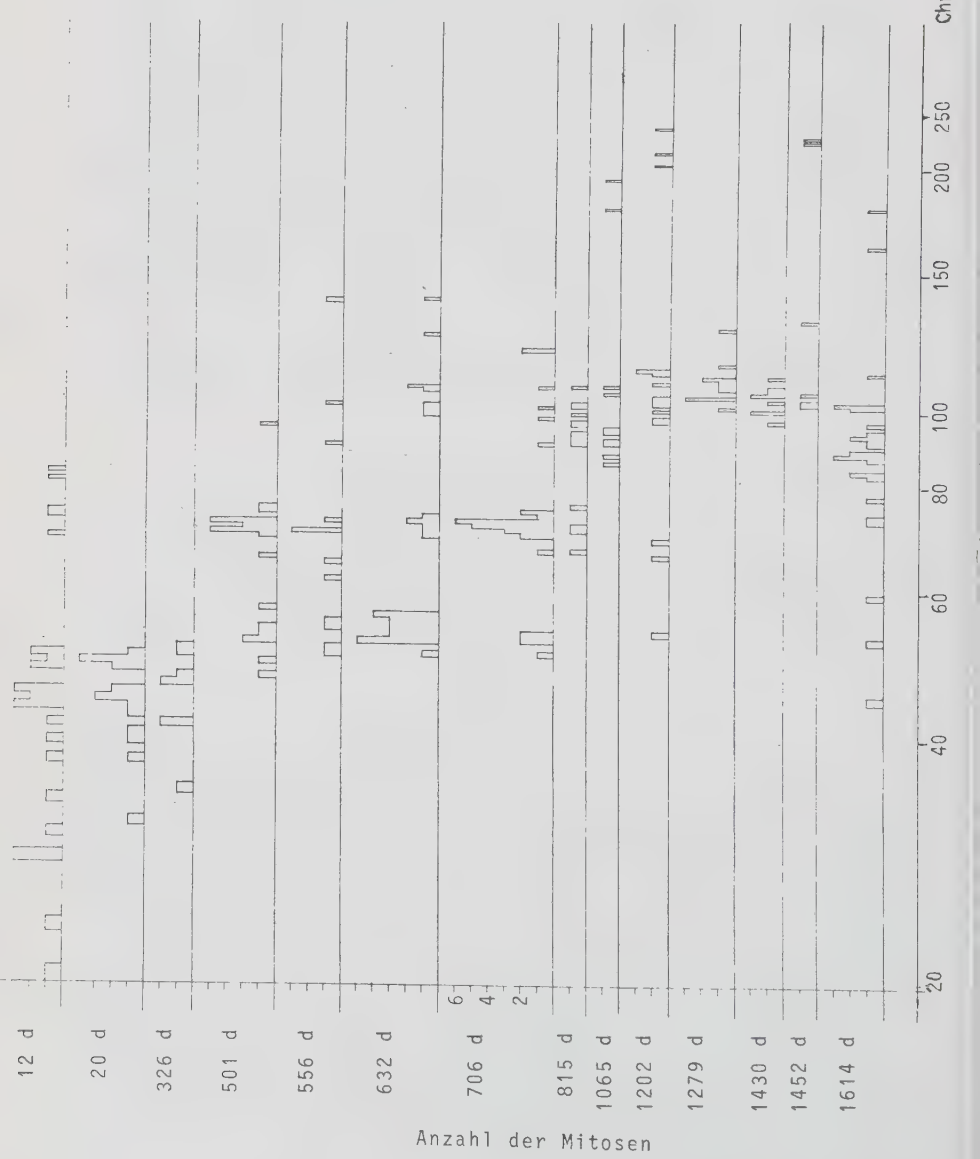
An einer aneuploiden Lungen-Fibroblastenkultur einer weiblichen Erdmaus (Microtus agrestis) wurde über einen Zeitraum von 4 Jahren (21.06.72 - 10.11.76) in 14 von insgesamt 720 verschiedenen Subkulturen Chromosomenanalysen an 260 Mitosen durchgeführt. Die zeitlichen Abstände zwischen den untersuchten Subkulturen (S.K.) waren nicht gleich (vgl. Abb. 1 und 2). Die Zahl der auswertbaren Mitosen schwankte erheblich. Meistens enthielten die Präparate eine geringe Zahl an Mitosen. Alle auswertbaren Mitosen wurden fotografiert und analysiert. Nach der Zahl der Chromosomen pro Mitose wurden 5 Ploidiegruppen unterschieden: diploide (50 Chromosomen), triploide (75), tetraploide (100) und pentaploide (125) mit einer Abweichung von je $\pm$ 12, und Mitosen mit über 138 Chromosomen.

1. Zahl der Chromosomen zu verschiedenen Kulturzeiten

Abb. 1 zeigt die Häufigkeitsverteilung der Chromosomenzahlen aus den 14 Subkulturen. Aus dieser Abb. ist zu erkennen, daß die Chromosomenzahl pro Mitose mit fortschreitender Kulturzeit ansteigt. Die Zahl der Chromosomen wird von ursprünglich überwiegend diploiden auf tetra- und höher ploide Sätze verlagert.

Abb. 2 stellt den zeitlichen Verlauf des Auftretens unterschiedlichen Ploidiestufen dar. In den ersten 16 Monaten beherrschten die diploiden Mitosen mit einer Häufigkeit zwischen 83 und 100 % die Kultur. Danach stiegen die Häufigkeiten der triploiden und langsam auch der tetraploiden Mitosen an. Der Gipfel der Triploidie lag mit 62 bis 66 % im 2. Jahr, während das Maximum tetraploider Zellen besonders im 3. Jahr (72 - 76 %) und im 4. Jahr (85 - 100 %) in Erscheinung trat. Die ersten Mitosen mit 125 Chromosomen waren in der S.K. 5 (556. Tag) und die ersten mit über 138 in S.K. 9 (1.065. Tag) zu sehen. Als höchster Wert wurden 223 Chromosomen pro Mitose beobachtet. Interessant sind die Schwankungen der Chromosomenzahl innerhalb jeder Gruppe.

Abb. 1: Verteilung der Chromosomenzahlen/Mitose in den 14 verschiedenen Subkulturen.



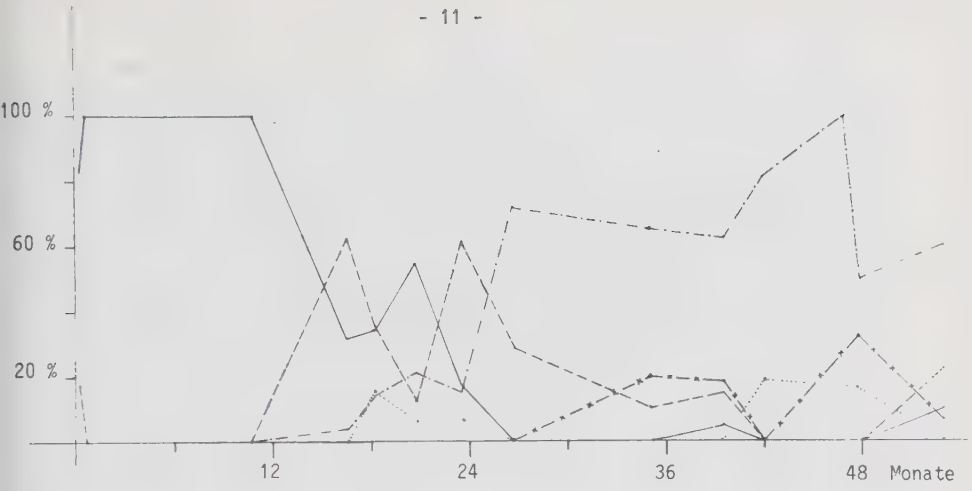


Abb. 2: Veränderungen der Ploidie der Mitosen während der Kulturdauer. —— 2n (38 - 62 Chromosomen), ---- 3n (63 - 87), -.-.- 4n (88 - 112), ... 5n (113 - 137), -x-x- > 5n (⩾138).

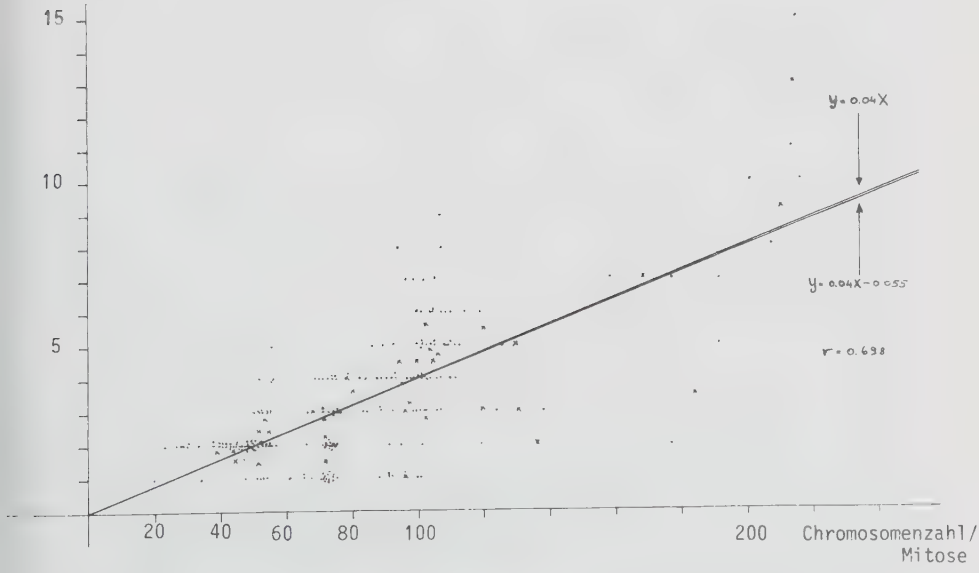


Abb. 3: Zahl der Markerchromosomen bezogen auf die Chromosomenzahl pro Mitose (n = 260) und Darstellung der zu erwartenden und der errechneten Regressionsgeraden.

Bei der diploiden Gruppe betrug sie bis zur S.K. 3 (326. Tag) unter 50 (z. B. 39.3, 44.2 und 44.5). Ab S.K. 4 (501. Tag) stieg die Zahl auf 52.0, 54.4, 53.7 und 52.6. In der triploiden Gruppe wurde der Sollwert von 75 nie erreicht (z. B. 71.8, 70.3, 72.2, 71.5). Die tetraploiden Mitosen, die zum ersten Mal in der S.K. 4 (501. Tag) zu sehen waren, enthielten bis zur S.K. 9 (1065. Tag) weniger als 100 Chromosomen (z. B. 96.0, 96.5, 99.2 und 97,2). Ab S.K. 10 (1202. Tag) waren mehr als 100 vorhanden: 104.4, 106.3, 103.6 und 103.3.

Die S.K. 14 (1614. Tag) enthielt eine hohe Zahl an Mitosen. Die Mitosen waren jedoch so stark gestreut, daß die Zuordnung der einzelnen Chromosomen zu einer Mitose oft schwierig war. Die Ergebnisse dieser Subkultur zeigten deshalb erhebliche Abweichungen von den übrigen Kulturen.

Abb. 3 zeigt die Beziehung zwischen der Häufigkeit der X-Chromosomen zur Chromosomenzahl pro Mitose. Aus den verschiedenen Punkten ergab sich die Regressionsgerade $y = 0.04x - 0.055$; Die Sollgerade wäre $y = 0.04x$. Dies bedeutet eine negative Abweichung bei diploiden Mitosen von 2.25 %, bei tetraploiden von 1.37 % und bei octaploiden von 0.07 % vom Sollwert. Beide Geraden wurden eingezeichnet. Der empirische Korrelationskoeffizient betrug 0.698.

2. Struktur der Chromosomen zu verschiedenen Kulturzeiten

2.1. Markerchromosomen

Die von typischen M. agrestis-Chromosomen morphologisch abweichenden Chromosomen wurden als Markerchromosomen bezeichnet. Nach der Morphologie ließen sich zunächst 5, nach BrdU-Markierung weitere 3 verschiedene Markerchromosomen als von den X-Chromosomen abstammend diagnostizieren, andere Markerchromosomen stammten von Autosomen ab. Die Markerchromosomen (Abb. 4) wurden nach dem Längenverhältnis kurzer zu langem Arm unterschieden, wobei die X-Markerchromosomen stets den vollständigen kurzen Arm eines normalen X (Länge 1) und der mehr oder weniger stark deletierte Rest des langen, konstitutiv heterochromatischen Armes enthielten, auf den z. T.

autosomale Fragmente transloziert waren.

2.2. Einteilung, Vorkommen und Häufigkeit der Markerchromosomen

Die Markerchromosomen wurden mit willkürlich gewählten Buchstaben bezeichnet (Abb. 4). Ihr Vorkommen und ihre Häufigkeit in den verschiedenen Subkulturen sind in den Tabellen 1, 2 und 3 zusammengestellt. Zur Unterscheidung von den X-Markerchromosomen wurde das normale X-Chromosom mit dem Armverhältnis 1 : 2 Typ "A" genannt. Es kam bei fast allen triploiden Zellen mit einer durchschnittlichen Anzahl von 1.0/Mitose vor. Bei den diploiden verschwand das normale X mit der Zeit (ab S.K. 6, 632. Tag), und zwar, wie in S.K. 1 (12. Tag) und S.K. 2 (20. Tag) zu sehen war, wahrscheinlich aufgrund von Brüchen im X, die im langen Arm häufiger (43 % aller X-Chromosomen) als im kurzen Arm (5 %) vorkamen (Abb. 4). Bei den tetraploiden und pentaploiden wie auch bei den polyploiden Mitosen über 138 war Typ "A" kaum vorhanden (≤ 0.2), nur einmal war er mit 2.0 vertreten.

Das Markerchromosom "B" ist ein großes metazentrisches Chromosom mit dem Armverhältnis 1 : 1. Es kam immer bei den tetraploiden vor, und zwar ab S.K. 9 (1065. Tag) mit einer Häufigkeit zwischen 1.5 und 2.0, ansonsten bei dieser Gruppe um 1.0. Bei den pentaploiden und polyploiden Zellen über 138 trat dieses Markerchromosom nach dem 1202. Tag (S.K. 10) mit einer Häufigkeit von 2.5 - 3.5 auf. In den triploiden Zellen war es außer in zwei Fällen (0.5, 1.0) nie vorhanden. Bei den diploiden lag seine Zahl am Anfang um 0.8, ab S.K. 6 (632. Tag) unter 0.2.

Das Markerchromosom "C" ist ein submetazentrisches Chromosom mit dem Armverhältnis 2 : 1. Es trat besonders häufig bei den tetraploiden Zellen auf, zeigte hier jedoch während der Kulturzeit eine absteigende Häufigkeit (0.75 → 0.40). Die Häufigkeit von Typ "C" lag bei den diploiden und triploiden Zellen zwischen 0.3 und 0.5; es verschwand jedoch ab S.K. 8 (815. Tag). Auch bei den polyploiden Zellen über 138 war Typ "C" vorhanden, und zwar in S.K. 13 (1452. Tag) mit einer Häufigkeit von 2.5.

Abb. 4

Abb. 4: Chromosomen von M. agrestis nach Diamantfuchsinfärbung bzw. (nur 4. Reihe) Giemsafärbung nach BrdU. Vergr. 2.400 : 1. Normale X-Chromosomen (obere Reihe), Brüche (Pfeil) und Translokationen von X-Chromosomen (2. Reihe), verschiedene X-Markerchromosomen (3. und 4. Reihe, Einteilung siehe Abb. 6), autosomale Translokationen im Vergleich zu einem normalen X-Chromosom (unterste Reihe).

Das Markerchromosom "D" ist ein submetazentrisches Chromosom mit dem Armverhältnis 4 : 1. Im Gegensatz zu den tetraploiden Zellen, wo seine Häufigkeit von 0.6 auf 1.5 anstieg, wurde Typ "D" bei den triploiden Mitosen nie gefunden. In diploiden Zellen trat es zwischen S.K. 5 (556. Tag) und S.K. 7 (706. Tag) mit zunehmender Häufigkeit (0.4 → 0.8) auf. Bei den polyploiden über 138 war es mit unterschiedlichen Häufigkeiten vorhanden, aber immer gleich oder über 1.0 (2.0, 1.0, 1.0, 2.5).

Das Markerchromosom "E" ist durch den vollständigen Verlust des langen Armes eines normalen X-Chromosoms charakterisiert, so daß nur noch der kurze Arm vorhanden ist. In seiner Häufigkeit während der Kulturdauer zeigte es fast eine umgekehrte Proportionalität zum Markerchromosom "B". Es war in allen Ploidieklassen vorhanden und seine Häufigkeit nahm mit der Kulturzeit zu, z. B. in S.K. 13 (1452. Tag): tetraploide 1.75, pentaploide 3.0 und polyploide über 138 5.5.

Das Markerchromosom "Z" ist ein großes akrozentrisches Chromosom, länger als ein kurzer Arm eines normalen X-Chromosomes. Wie die BrdU-Markierung gezeigt hat (siehe Abb. 4), ist es vermutlich durch Bruch im zentromernahen Bereich von X_p und Translokation eines Autosoms auf das Bruchstück entstanden, so daß der Mittelteil von Markerchromosom "Z" den konstitutiv heterochromatischen X_p-Anteil enthält. Wie aus Tab. 2 ersichtlich, beträgt seine Größe 120 - 145 % der Länge von X_p. Eine Korrelation zwischen

Tab. 1

Häufigkeit von Markerchromosomen (MC) pro Mitose *

Kultur-dauer in Tagen	Ploidie-klasse	X-chromosomale MC						auto-som. MC	Zahl der Mitosen
		A	B	C	D	E	Z		
	2n	0.45	0.85	0.15	-	-	-	0.85	7
	3n	0.80	0.20	-	-	0.50	-	1.35	14
501	4n	-	1.00	-	-	-	2.00	-	1
	5n	-	-	-	-	-	-	-	-
	> 5n	-	-	-	-	-	-	-	-
									22
	2n	0.40	0.80	0.20	0.40	-	0.60	0.80	5
	3n	0.75	-	0.25	-	-	-	1.00	5
556	4n	-	0.75	0.75	-	-	-	1.00	4
	5n	-	-	-	-	-	-	-	-
	> 5n	-	-	-	-	-	-	-	-
									14
	2n	-	0.20	0.25	0.95	0.55	0.85	1.20	19
	3n	1.00	-	0.35	-	0.65	-	0.65	6
632	4n	-	1.00	0.57	0.57	0.28	0.45	2.28	7
	5n	2.00	-	-	0.50	-	0.50	2.00	2
	> 5n	-	-	-	-	-	-	-	-
									34
	2n	-	0.20	-	0.80	1.00	0.40	1.00	5
	3n	1.00	-	0.20	-	1.05	-	1.80	20
706	4n	0.25	0.75	0.75	0.25	2.25	0.25	2.00	4
	5n	0.50	0.50	1.00	-	1.00	0.50	1.50	2
	> 5n	-	-	-	-	-	-	-	-
									31
	2n	-	-	-	-	-	-	-	-
	3n	0.50	0.50	0.50	-	1.25	-	1.50	4
815	4n	0.20	0.90	0.30	0.20	0.70	0.80	2.00	10
	5n	-	-	-	-	-	-	-	-
	> 5n	-	-	-	-	-	-	-	-
									14

Fortsetzung Tab. 1

Kultur-dauer in Tagen	Ploidie-klasse	X-chromosomale MC						auto-som. MC	Zahl der Mitosen
		A	B	C	D	E	Z		
	2n	-	-	-	-	-	-	-	-
	3n	1.00	1.00	-	-	3.00	-	-	1
1065	4n	0.15	1.15	0.15	0.35	2.15	0.15	1.28	7
	5n	-	-	-	-	-	-	-	-
	> 5n	-	0.50	1.00	2.00	-	-	6.50	2
									10
	2n	1.00	-	-	-	1.00	-	2.00	1
	3n	1.00	-	-	-	1.50	0.50	1.50	2
1202	4n	-	1.40	0.50	0.60	0.80	1.10	3.60	10
	5n	-	-	-	-	-	-	-	-
	> 5n	-	3.66	0.33	1.00	2.00	2.33	4.33	3
									16
	2n	-	-	-	-	-	-	-	-
	3n	-	-	-	-	-	-	-	-
1279	4n	-	2.00	0.33	1.11	0.78	1.00	3.22	9
	5n	-	2.50	-	1.00	1.00	1.00	4.00	2
	> 5n	-	-	-	-	-	-	-	-
									11
	2n	-	-	-	-	-	-	-	-
	3n	-	-	-	-	-	-	-	-
1430	4n	-	1.55	0.45	0.90	1.11	1.00	2.80	9
	5n	-	-	-	-	-	-	-	-
	> 5n	-	-	-	-	-	-	-	-
									9
	2n	-	-	-	-	-	-	-	-
	3n	-	-	-	-	-	-	-	-
1452	4n	-	1.00	0.66	1.66	1.66	-	3.33	3
	5n	-	1.00	1.00	-	3.00	-	8.00	1
	> 5n	-	2.50	3.50	1.00	5.50	1.50	7.50	2
									6

Fortsetzugn Tab. 1

Kultur-dauer in Tagen	Ploidie-klasse	X-chromosomale MC						auto-som. MC	Zahl der Mitosen
		A	B	C	D	E	Z		
	2n	-	1.00 0.33	-	0.33	-	-	2.33	3
	3n	0.43	0.70 0.85	-	1.00	0.28	0.28	2.85	7
1614 **	4n	0.11	0.80 0.90	0.11	0.95	0.40	0.55	3.05	18
	5n	-	-	-	-	-	-	-	-
	> 5n	1.0	0.50 1.50	-	2.50	-	1.50	4.50	2
									30

* Die Subkulturen 1 (12 Tage); 2 (20 Tage) und 3 (326 Tage) wurden in den Tab. 1, 2 und 3 nicht berücksichtigt. Eine eindeutige Einteilung der verschiedenen Markerchromosomen war hier noch nicht möglich.

** In der Subkultur 14 (1614 Tage) wurden die Chromosomen mit BrdU markiert. Das Markerchromosom "B" ließ sich dabei in die beiden X-Markerchromosomen "G" und "M" unterteilen (vgl. Text). Die obere Zahl gibt die Häufigkeit von "G", die untere von "M" an.

seiner Länge und einer bestimmten Ploidiegruppe konnte nicht beobachtet werden. Es kam in der triploiden Gruppe nur ein einziges Mal vor (S.K. 10, 1202. Tag), im Gegensatz zur tetraploiden Gruppe, wo es mit zunehmender Häufigkeit auftrat (0.4 → 1.0). Auch bei den diploiden, pentaploiden und polyploiden Zellen über 138 kam es häufig vor.

In Abb. 5 ist die prozentuale Abweichung der Zahl der X-Chromosomen oder X-Markerchromosomen vom Sollwert (1 pro haploider Satz mit 25 Chromosomen) dargestellt. Bis zu den S.K. 4 und 5 (501. bzw. 556. Tag) überwog ein Verlust an X-Chromosomen bzw. deren Marker-

Tab. 2

Anzahl des Markerchromosoms "Z"*

Kultur-dauer in Tagen	Ploidie-klasse	Länge des Markerchromosoms "Z" in Prozent der Länge von Xp						
		≦ 110	-120	-130	-140	-150	-160	-170
501	2n	-	-	-	-	-	-	-
	3n	-	-	-	-	-	-	-
	4n	-	-	-	-	-	-	-
	5n	-	-	-	-	-	-	-
	> 5n	-	-	-	-	-	-	-
556	2n	-	1	1	-	-	-	1
	3n	-	-	-	-	-	-	-
	4n	-	-	-	-	-	-	-
	5n	-	-	-	-	-	-	-
	> 5n	-	-	-	-	-	-	-
632	2n	-	2	3	7	2	1	1
	3n	-	-	-	-	-	-	-
	4n	-	-	-	1	-	-	1
	5n	-	-	1	-	-	-	-
	> 5n	-	-	-	-	-	-	-
706	2n	-	1	-	1	-	-	-
	3n	-	-	-	-	-	-	-
	4n	-	-	-	-	1	-	-
	5n	-	-	1	-	-	-	-
	> 5n	-	-	-	-	-	-	-
815	2n	-	-	-	-	-	-	-
	3n	-	-	-	-	-	-	-
	4n	-	-	4	4	-	-	-
	5n	-	-	-	-	-	-	-
	> 5n	-	-	-	-	-	-	-
1065	2n	-	-	-	-	-	-	-
	3n	-	-	-	-	-	-	-
	4n	-	-	-	-	-	1	-
	5n	-	-	-	-	-	-	-
	> 5n	-	-	-	-	-	-	-

Fortsetzung Tab. 2

Kultur-dauer in Tagen	Plastie-klasse	Länge des Markerchromosoms Y in Prozent der Länge von Xp						
		≤ 110	-120	-130	-140	-150	-160	-170
	2n	-	-	-	-	-	-	-
	3n	-	1	-	-	-	-	-
1202	4n	-	3	3	3	1	-	-
	5n	-	-	-	-	-	-	-
	> 5n	-	1	2	-	4	-	-
	2n	-	-	-	-	-	-	-
	3n	-	-	-	-	-	-	-
1279	4n	-	1	3	4	1	-	-
	5n	-	-	2	-	-	-	-
	> 5n	-	-	-	-	-	-	-
	2n	-	-	-	-	-	-	-
	3n	-	-	-	-	-	-	-
1430	4n	-	-	4	3	-	2	-
	5n	-	-	-	-	-	-	-
	> 5n	-	-	-	-	-	-	-
	2n	-	-	-	-	-	-	-
	3n	-	-	-	-	-	-	-
1452	4n	-	2	-	-	-	-	-
	5n	-	-	-	-	-	-	-
	> 5n	-	3	-	-	-	-	-
	2n	-	-	-	-	-	-	-
	3n	-	-	1	-	-	-	-
1514	4n	1	3	2	1	2	2	-
	5n	-	-	-	-	-	-	-
	> 5n	-	-	1	2	-	-	-

* siehe Fußnote von Tab. 1

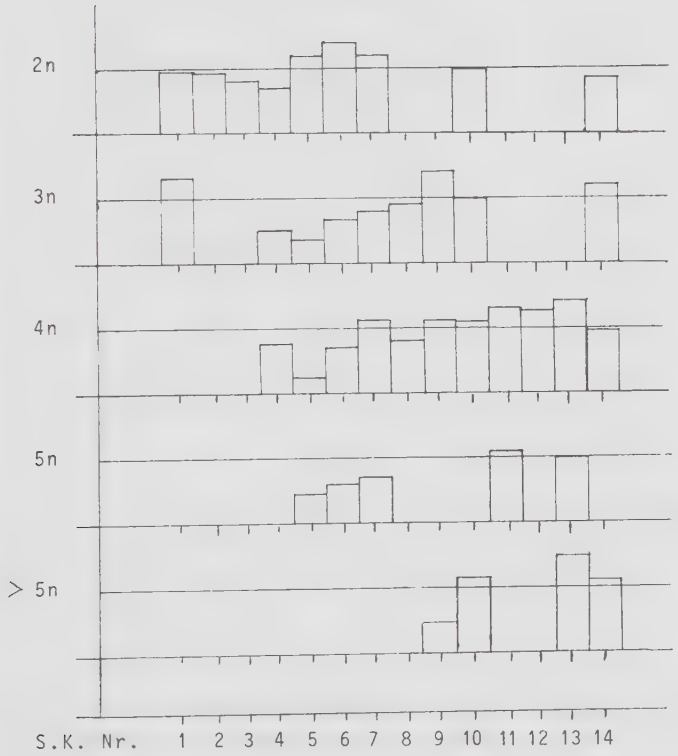


Abb. 5: Abweichung der Zahl der X-Chromosomen bzw. X-Markerchromosomen pro Mitose vom Sollwert (durchgezogene Linie) in den verschiedenen Ploidieklassen.

chromosomen. Danach wurde er kompensiert, teilweise stieg ihre Zahl über den Sollwert. Aus Abb. 5 ergibt sich weiter, daß in einzelnen Subkulturen Verluste von X-Chromosomen in triploiden oder tetraploiden Mitosen teilweise durch einen Überschuß in den diploiden Mitosen kompensiert wurden.

Bei Einzelanalyse der Ploidieklassen nach Gewinn und Verlust von X-Chromosomen und X-Markerchromosomen (siehe Tab. 1) zeigen

diploide Mitosen (Sollwert 2) eine Abnahme bis zur S.K. 4 (501. Tag), bedingt durch den Verlust von Typ "A" (0.4) und "B" (0.8). Danach trat trotz weiterer Abnahme von "A" und "B" eine Zunahme durch das Vorkommen von "D" (0.8 - 0.9), "E" (0.6 - 1.0) und "Z" (0.6 - 0.8) auf.

Triploide Mitosen (Sollwert 3): Die Zunahme der Chromosomen "A" und "B" verursachte erst in der S.K. 9 (1065. Tag) einen Ausgleich des Sollwertes.

Tetraploide Mitosen (Sollwert 4): Bis zu S.K. 6 (632. Tag) war der X-Verlust bedingt durch das Fehlen des Typ "A" und das Vorkommen von "B" und "C" nur in 0.8. Danach trat ein Gewinn ein, der in erster Linie durch "E", später durch "B" (1.5), "D" (0.9) und manchmal auch "Z" (1.0) entstanden war.

Pentaploide Mitosen (Sollwert 5): Am Anfang überwog ein Verlust ("A" 2.0; "D" und "Z" je 0.5). Der Gewinn ab S.K. 11 (1279. Tag) kam durch das Vorkommen von "B" (2.5) und "D", "E" und "Z" (je 1.0) zustande. In S.K. 13 (1451. Tag) wurde eine Abnahme von "B" (1.0) und Zunahme von "E" (3.0) beobachtet.

Polyploide Mitosen über 138: Wegen der unterschiedlichen Chromosomenzahl in dieser Gruppe wurde der Sollwert für jede Mitose getrennt berechnet (n : 25). Abgesehen von S.K. 9 (1065. Tag) enthielten alle Mitosen mehr X-Chromosomen als ihrem Sollwert entsprach. Dies wurde unterschiedlich durch vermehrtes Auftreten von "B", "C", "E" und "Z" bedingt.

2.3. BrdU-Markierung der Markerchromosomen

Die Zellen von S.K. 14 (1614. Tag) wurden 5 h lang mit BrdU behandelt. Hierbei zeigt sich, daß viele X-Markerchromosomen am Ende des ursprünglich langen, konstitutiv heterochromatischen Armes ein frühreplizierendes Stück enthielten. Dies deutet auf eine Translokation eines euchromatischen Autosomenfragments auf den mehr oder weniger stark deletierten langen X-Arm hin.

Eine Anzahl von nach ihrem Replikationsmuster und der Verteilung von Eu- und Heterochromatin unterschiedlichen X-Anomalien in verschiedenen M. agrestis-Kulturen wurde von Pera (unveröffentlicht) zusammengestellt (Abb. 6). Da bei der hier untersuchten Kultur nur in der letzten Subkultur eine BrdU-Markierung durchgeführt wurde, und eine nachträgliche Färbung des konstitutiven Heterochromatins in den teilweise mehrere Jahre alten Präparaten nicht mehr möglich war, konnte nicht geklärt werden, ob in den älteren Präparaten zumindest ein Teil der als Typ "A" bezeichneten Chromosomen von der DNS-Zusammensetzung her eigentlich Typ "F" wäre, "B" entweder "G" oder das iso-X_p "M", das wahrscheinlich durch Robertsonsche Translokation zweier Typ-"E"-Chromosomen entstanden ist, "C" der Typ "H", und "D" der Typ "I". Die Typen "A" bis "D" (Abb. 6) kamen in der S.K. 14 (1614. Tag) nicht vor.

In der BrdU-markierten Kultur kamen die Typen "M" und "G" in allen Mitosen vor (siehe Tab. 1): bei Zunahme der Chromosomenzahl pro Mitose fanden sich mehr "M" als "G": bei diploiden M/G = 0.35/1.0, bei triploiden 0.85/070, bei tetraploiden 0.90/0.80 und bei polyploiden über 138 1.5/0.5. Die Zunahme von "M"-Chromosomen läßt sich möglicherweise durch das Verschwinden bzw. die stärkere Abnahme des Typ "E" erklären, der durch zentrische Fusion den Typ "M" gebildet hat (vgl. S.K. 13 und 14, Tab. 1). Das Markerchromosom "D" bzw. "I" kam in fast allen Gruppen vor: in triploiden Mitosen 1.0; tetraploiden 0.9 und polyploiden über 138 2.5. Auch das Markerchromosom "Z" nahm mit steigender Ploidie in seiner Häufigkeit zu, z. B. in triploiden 0.3, tetraploiden 0.6 und polyploiden über 138 1.5.

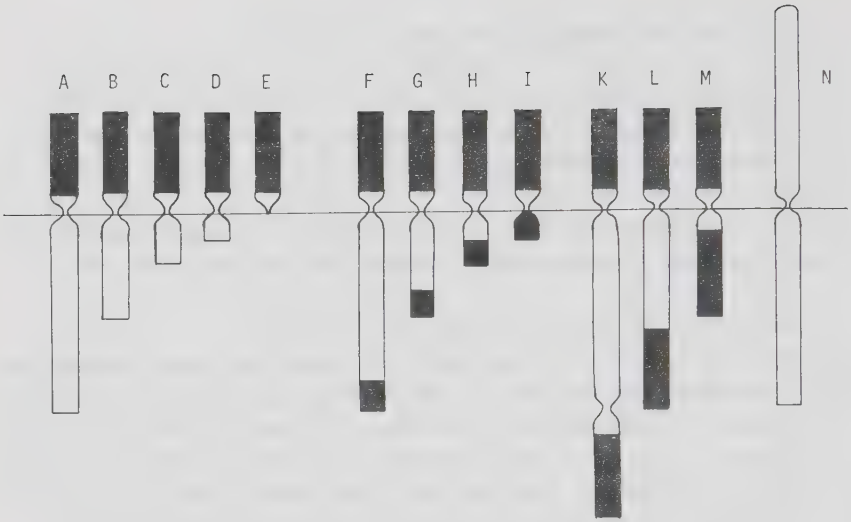


Abb. 6: Schematische Darstellung von X-Chromosomen-Anomalien in verschiedenen M. agrestis-Kulturen. Schwarz: Euchromatin oder fakultatives Heterochromatin. Weiß: konstitutives Heterochromatin (nach Pera, unveröffentlicht).

2.4. Sonstige Markerchromosomen

Das letzte in dieser Kultur beobachtete Markerchromosom, das von den X-Chromosomen stammte, ist der Typ "N" (siehe Abb. 4 und 6). Es ist ein sehr großes metazentrisches Chromosom, das wahrscheinlich durch Robertson'sche Translokationen der langen Arme zweier X-Chromosomen entstanden war. Dieses nur aus konstitutivem Heterochromatin bestehende Markerchromosom kam sehr selten vor (1.92 % aller untersuchten Mitosen).

Die häufigsten Markerchromosomen in der untersuchten Kultur waren autosomaler Herkunft (siehe Abb. 4). Sie waren annähernd metazentrisch und kamen in allen Ploidiegruppen der verschiedenen Subkulturen vor. Ihre Häufigkeit nahm mit der Zeit gering-

Tab. 3

Anzahl der autosomalen Markerchromosomen *

Kulturdauer in Tagen	Ploidieklasse	Länge der autosomalen Markerchromosomen in Prozent der Länge von Xp													
		≤40	-50	-60	-70	-80	-90	-100	-110	-120	-130	-140	-150	-160	-170
501	2n	-	1	2	1	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-
	3n	1	5	4	3	4	1	1	-	-	-	-	-	-	-
	4n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
	5n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	>5n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
552	2n	-	1	1	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
	3n	1	1	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4n	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-
	5n	-	-	2	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	>5n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
632	2n	-	2	-	1	-	-	8	4	2	2	1	3	-	-
	3n	-	-	1	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4n	-	-	1	-	-	-	6	1	-	6	-	2	-	-
	5n	1	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	>5n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
706	2n	1	3	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3n	-	6	6	6	7	1	3	2	-	1	3	-	1	-
	4n	-	-	-	1	-	1	-	2	1	-	2	-	-	1
	5n	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	>5n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
815	2n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3n	-	2	1	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4n	-	1	-	-	3	1	10	1	1	-	-	-	-	-
	5n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	>5n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1065	2n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
	4n	-	-	-	-	2	1	-	2	1	2	-	1	-	-
	5n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	>5n	-	-	-	-	4	-	-	1	3	-	-	5	-	-

Fortsetzung Tab. 3

Kultur-dauer in Tagen	Ploidie-klasse	Länge der autosomalen Markerchromosomen in Prozent der Länge von Xp													
		≤40	-50	-60	-70	-80	-90	-100	-110	-120	-130	-140	-150	-160	-
1202	2n	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	
	3n	-	1	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4n	-	2	3	3	8	3	8	3	-	1	-	-	-	
	5n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	> 5n	-	2	-	-	5	2	3	-	1	-	-	-	-	
1279	2n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	3n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4n	-	3	10	6	2	1	4	1	2	-	-	-	-	
	5n	-	-	1	2	2	-	3	1	-	-	-	-	-	
	> 5n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1430	2n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	3n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4n	-	4	6	-	4	4	6	-	-	-	-	-	-	
	5n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	> 5n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1452	2n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	3n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4n	-	1	1	-	2	-	5	1	-	-	1	-	-	
	5n	-	-	1	-	-	5	2	-	-	-	-	-	-	
	> 5n	-	2	1	-	2	2	4	4	-	-	-	-	-	
1614	2n	-	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	1	
	3n	-	3	4	3	2	3	3	1	-	1	-	-	-	
	4n	-	6	7	21	10	7	3	-	1	-	-	-	-	
	5n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	> 5n	-	1	2	2	-	3	-	-	-	-	-	-	-	

* siehe Fußnote von Tab. 1

fügig zu (siehe Tab. 1 und 3). Die Gesamtlänge dieser Marker-chromosomen wurde auf die Länge eines kurzen Armes eines X-Chromosomen bezogen (Tab. 3). Während ihre Länge bei den triploiden Zellen zwischen 50 - 85 % betrug, lag sie sowohl bei den diploiden als auch bei den tetraploiden Zellen im ersten und zweiten Jahr bei 100 % und mehr, und sank danach auf 55 - 80 % bzw. 90 - 100 %. Dies zeigt, daß mit zunehmender Kulturdauer häufiger Translokationen von kleineren Autosomen stattfanden.

DISKUSSION

Die Langzeitbeobachtung der Zellkultur einer weiblichen Erdmaus, M. agrestis, die sich über mehr als 4 Jahre erstreckte, zeigte folgende Ergebnisse:

a) Im Verlauf dieser Beobachtungszeit traten große Verluste des konstitutiven Heterochromatins der X-Chromosomen auf.

b) Trotz dieses Verlustes behielten die Zellen ihre Lebens- und Vermehrungsfähigkeit weiter uneingeschränkt.

c) Auch die euchromatischen Autosomen waren von strukturellen und numerischen Aberrationen betroffen.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Heterochromatinverlust und der Zellentartung nachgehen zu können, sollen diese Begriffe zunächst einzeln diskutiert werden.

1. Heterochromatin

Heitz (1933), dem wir den Terminus Heterochromatin verdanken, definierte ihn folgendermaßen: "Als Heterochromatin bezeichne ich also ein in der Grundsubstanz des Ruhekernes sichtbar vorhandenes, in Bezug auf die Längsrichtung des Chromosoms bestimmt gelegenes Stück desselben, welches mindestens in der Telo- und Prophase, manchmal auch in der Anaphase und Metaphase stärker färbbar ist als die übrigen Stücke, als das die Grundsubstanz bildende Euchromatin." Das Sichtbarbleiben von bestimmten Chromosomenabschnitten auch im Interphasekern, durch fehlende Entspiralisation verursacht, ist ein Merkmal des Heterochromatins; man nennt diese Eigenschaft Heteropyknose.

Seit den Arbeiten von Schrader (1929) und Lyon (1961, 1972) unterscheidet man zwei verschiedene Arten von Heterochromatin: das fakultative und das konstitutive Heterochromatin. Beide Arten zeigen z. T. ähnliche Eigenschaften: sie können sich in der Interphase in kondensiertem Zustand befinden und Chromozentren bilden; diese

liegen oft in der Nähe der Kernmembran. Sie synthetisieren die DNS später, aber schneller, als das Euchromatin und replizieren auch in kondensiertem Zustand. Meist sind sie transkriptionsinaktiv. Ein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Arten ist, daß das konstitutive Heterochromatin aus hochrepetitiver DNS besteht, während das fakultative Heterochromatin wie auch das Euchromatin aus unterschiedlichen Basensequenzen aufgebaut ist (Lit. bei Schwarzacher, 1976).

1.1. Fakultatives Heterochromatin

Das fakultative Heterochromatin wird als Inaktivierungszustand eines zunächst aktiven Chromosoms gesehen, das zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Ontogenese inaktiviert wurde. Bei den Säugern tritt das fakultative Heterochromatin nur im weiblichen Geschlecht auf. Nach der Lyon-Hypothese (Lyon, 1961) ist eines der beiden X-Chromosomen inaktiv. Diese Inaktivierung eines X-Chromosomes wird als Dosis-Kompensationsmechanismus zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen dem weiblichen Geschlecht mit 2 X-Chromosomen und dem männlichen Geschlecht mit nur einem X-Chromosom angesehen. Bei M. agrestis befindet sich das fakultative Heterochromatin auf den kurzen Armen des X_2-Chromosoms des Weibchens. Es macht ca. ein Viertel des gesamten X-Chromosoms aus; an homologer Stelle des X_1-Chromosoms liegt der euchromatische Anteil (Pera, 1970). Pera und Wolf (1967) nannten das fakultative Heterochromatin des X_2 "Sexchromatinanteil", weil es in Zellen ohne große Chromozentren das Sexchromatin-Körperchen bildet. Schmid (1967) fand, daß sich das X_2 in der Metaphase morphologisch vom X_1 durch die Chromatidapposition der kurzen Arme unterscheiden läßt.

Wie Pera (1968) gezeigt hat, repliziert das fakultative Heterochromatin viel später als das Euchromatin; im Falle von M. agrestis beginnt das fakultative Heterochromatin seine DNS-Synthese nach 60 % und endet bei 90 % der gesamten Synthesedauer.

1.2. Konstitutives Heterochromatin

Konstitutives Heterochromatin wurde in den meisten Pflanzen- und Tierspezies nachgewiesen. Bei M. agrestis kommt der größte Teil des konstitutiven Heterochromatins auf jeweils homologen Abschnitten der beiden X-Chromosomen des Weibchens bzw. auf den X- und Y-Chromosomen des Männchens vor.

Heteropyknose, d. h. Kondensiertbleiben in der Interphase, ist keine konstante Eigenschaft des konstitutiven Heterochromatins. Wie aus den Arbeiten von Schmid (1967) und Pera (1969_a) hervorgeht, bilden die beiden großen Blöcke des konstitutiven Heterochromatins, die auf den Geschlechtschromosomen lokalisiert sind, nicht in allen Zelltypen zwei heteropyknotische Körper in der Interphase. Sieger, Pera und Schwarzacher (1970) fanden in Nerven- und Gliazellen von M. agrestis stets große kompakte Chromozentren, während die Zellkerne von Fibroblasten frei von Chromozentren waren. Hier waren nur in der frühen Prophase zwei stärker kondensierte Chromosomen und in 30 - 50 % der weiblichen Fibroblasten ein kleines sexchromatinähnliches Chromozentrum zu beobachten. In den übrigen weiblichen Fibroblasten waren keine heteropyknotischen Strukturen zu erkennen. Für das Auftreten von Chromozentren spielen neben dem Zelltyp aber auch die Differenzierungsstufe und der aktuelle Funktionszustand eine große Rolle (zusammenfassende Darstellung bei Pera, 1980).

Unabhängig von der variablen Eigenschaft Heteropyknose ist das konstitutive Heterochromatin stets spätreplizierend. Bei M. agrestis beginnt seine DNS-Synthese bei ca. 70 % der gesamten S-Periode und dauert bis zum Ende der S-Periode, wobei ein Teil des X_2 etwa drei Minuten länger synthetisiert als X_1 (Wolf et al., 1965; Schmid et al., 1965; Pera und Wolf, 1967; Schmid, 1967; Pera, 1968 und 1970 und Schmid und Leppert, 1969).

1.3. Molekularer Aufbau des Heterochromatins

Während der letzten Jahre gelang es, mittels neuer Markierungs- und Färbungsmethoden das konstitutive Heterochromatin spezifisch darzustellen und die Lokalisation von hochrepetitiven Polynukleotidsequenzen innerhalb des konstitutiven Heterochromatin nachzuweisen.

Das Auftreten von Chromosomenbändern nach spezieller Vorbehandlung und Färbung oder nach Fluorochromierung erlaubt eine genaue Identifizierung aller Chromosomen. Für die Entstehung der Chromosomenbänderung werden vier Faktoren besonders hervorgehoben, nämlich der Gehalt an repetitiver DNS, Unterschiede in der Basenzusammensetzung der DNS, in der Proteinkomponente und in der Verpackung der DNS.

1.3.1. Repetitive DNS

Nach Zentrifugation von DNS im Cs-Cl-Dichtegradient bildet der größte Teil der DNS einen deutlichen "peak", der bei M. agrestis 1.699 g/cm³ beträgt, neben kleinen peaks mit unterschiedlicher Dichte (Kit, 1961). Diese kleinen peaks unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung von der Hauptmasse. Fraktionen, die an Guanin und Cytosin (GC) reich sind, haben eine hohe "buoyant density", während Fraktionen, die Adenin und Thymidin (AT) in großen Mengen enthalten, einen niedrigen Wert haben. Diese DNS-Fraktionen werden als Satelliten-DNS bezeichnet. Waring und Britten (1966) konnten den Beweis erbringen, daß die Sat-DNS aus identischen wiederholten Sequenzen besteht. Sie fanden, daß die Maus-DNS über 10^6 identische Sequenzen enthält. Nach den Befunden von Southern (1970) bei Meerschweinchen besteht eine einzelne Sequenz aus 8 - 13 Basen. Verschiedene Species haben unterschiedliche und entsprechend charakteristische Sat-DNS (Hennig und Walker, 1970; Arrighi et al., 1970; Yunis und Yasmineh, 1970). Die menschliche DNS enthält mindestens vier verschiedene Satellitenfraktionen (Saunders, Hsu, Getz, Simes, Arrighi, 1972_a; Saunders, Shirakawa, Saunders, Arrigi, Hsu, 1972_b; Jones, Prosser, Corneo, Ginelli, Bobrow, 1973; Arrighi und Saunders, 1973). Bei M. agrestis konnten Yasmineh und Yunis

(1971) durch Hitzedenaturierung drei verschiedene repetitive DNS-Fraktionen unterscheiden: einen Sat-I Typ, der 2 % des Genoms einnimmt, Sat-II mit 6 % und einen "fast intermediate repetitive DNA"-Typ, dessen Anteil 15 % beträgt und somit die größte Fraktion von repetitiver DNS innerhalb des konstitutiven Heterochromatins darstellt. Das Verhältnis von AT-Basen zu GC-Basen ist in allen Fraktionen größer als 1, in Sat-I sogar 2.00. Arrighi und Saunders (1973) zeigten, daß 30 - 35 % des menschlichen Genoms aus repetitiver DNS besteht. Bei Kalb-Thymus-DNS besteht 41 % (Britten und Smith, 1969), bei M. agrestis 34.7 % der totalen DNS aus repetitiven Sequenzen (Arrighi et al., 1970).

Das konstitutive Heterochromatin besteht jedoch nicht ausschließlich aus repetitiver DNS, und die repetitive DNS ist nicht nur im konstitutiven Heterochromatin lokalisiert (Arrighi et al., 1970; Cooper und Hsu, 1972). Nach Birnstiel, Speirs, Purdom, Jones, Loening (1968) enthalten auch die Nucleolus-organisierenden Regionen, die für die ribosomale Transskription verantwortlich sind, repetitive DNS, obwohl diese Regionen keine Heteropyknose in der Interphase zeigen.

1.3.2. Unterschiede in der Basenzusammensetzung der DNS

Weisblum und De Haseth (1972) zeigten, daß Guanin die Fluoreszenz von Quinacrin-mustard und Quinacrin-dihydrochlorid reduziert. Chromosomenabschnitte, die an GC-Basen relativ reich sind, fluoreszieren weniger oder gar nicht, während AT-reiche Regionen sehr hell fluoreszieren. AT-reiche DNS denaturiert bei niedrigen Temperaturen eher als GC-reiche DNS (Mandel und Marmur, 1968). Bei Hitzedenaturierung werden AT-reiche Regionen eher einsträngig und fluoreszieren nach Quinacrinfärbung eher (Q-Bänder) als GC-reiche Abschnitte. Nach dem gleichen Prinzip sind die nach Giemsa-Färbung auftretenden G-Bänder zu erklären. G- bzw. Q-Bänder enthalten also relativ mehr AT-Basen, während die Interbänder (reverse bands, R-Bänder) mehr GC-Basen enthalten (Lit. bei Schwarzacher, 1976). Eine wichtige Rolle für die Fluoreszenz von Quinacrin spielt nicht nur das Verhältnis von AT zu GC, sondern auch der Streuungsgrad der GC-Basen

zwischen den AT-Basen (Weisblum, 1973): Bei gleichmäßiger Verteilung der GC-Basen in der Polynukleotidkette tritt trotz AT-Reichtums keine Fluoreszenz auf (z. B. bei den sekundären Konstriktionen der menschlichen Chromosomen 1, 9 und 16).

1.3.3. Unterschiede in der Proteinzusammensetzung

Mit Hilfe von proteolytischen Enzymen wie Trypsin, Pankreatin, Chymotrypsin läßt sich in den Chromosomen ein Q- bzw. G-ähnliches Bänderungsmuster erzeugen (Seabright, 1972; Wang und Fedoroff, 1972; Müller und Rosenkranz, 1972). Nach Sehested (1973) lassen sich auch mit inaktiver Trypsinlösung (ohne Peptidase- und Esteraseaktivität) Chromosomenbänder erzeugen. Die proteolytische Wirkung soll nach Mc Kay (1973) durch Wegnahme der Kationenkomponente zur Schwellung der Chromosomen führen. Nach Einwirkung von zweiwertigen Kationen erfolgt eine Rekonstitution der Chromosomen-Morphologie, die besonders in den G-Bändern deutlich wird. Wegen ihrer polyvalenten kationischen Natur könnte die Giemsalösung selbst diese Wirkung haben.

Die Chromosomenbänder, die durch proteolytische Enzyme erzeugt werden, könnten somit durch Unterschiede in der Chromatinverpackung bedingt sein (Schwarzacher 1976). Leng und Felsenfeld (1966) und Clark und Felsenfeld (1972) fanden, daß AT-reiche DNS mit Lysin-reichen Histonen und GC-reiche DNS mit Arginin-reichen Histonen assoziieren. Nach den Ergebnissen von Littau, Burdick, Allfrey und Mirsky (1965) führen Lysin-reiche Histone zur Kondensation des Chromatins, während Arginin-reiche Histone die Chromatinkondensation verhindern. Die Q-Bänder, die mit wenigen Ausnahmen den G-Bändern gleichen, könnten deshalb Regionen repräsentieren, die reich an AT-Basen und durch ihren Lysinreichtum gleichzeitig auch stärker kondensiert sind.

1.3.4. Verpackungsunterschiede der DNS

Neben den oben angeführten Ergebnissen über Lysin-reiche und Arginin-reiche Regionen, die auf unterschiedliche DNS-Verpackung bzw. DNS-Proteinkomplexe hinweisen, sprechen auch direkte Beobachtungen dafür, daß Bänder, die mit verschiedenen Färbungs-

methoden erzeugt werden können, mit einer unterschiedlichen Verpackungsdichte des Chromatins korelieren (Schwarzacher 1976). So konnten Bahr und Golomb (1971) und Bahr , Mikel und Engler (1973) elektronmikroskopisch zeigen, daß die Verdichtungen entlang der Chromosomen mit den durch Giemsafärbung erzeugten Bändern übereinstimmen.

1.4. Genetische Aktivität des Heterochromatins

Die unterschiedliche genetische Aktivität von Euchromatin und Heterochromatin wurde zuerst von Müller und Painter (1932) bei Drosophila beschrieben. Zahlreiche Untersuchungen lassen heute keinen Zweifel, daß Heterochromatin-Chromosomenregionen im allgemeinen keine oder eine sehr niedrige genetische Aktivität besitzen. Müller und Painter (1932) und Cooper (1959) beobachteten ein Fehlen von Crossing-over zwischen heterochromatischen Segmenten: dies wurde als Zeichen für die Inaktivität des konstitutiven Heterochromatins angesehen. Im Gegensatz dazu deuteten Craig-Holmes, Moore und Shaw (1973), die bei vier menschlichen Individuen sieben verschiedene Heterochromatinmuster fanden, den Polymorphismus des Heterochromatins mit ungleichen Crossing-over zwischen den repetitiven DNS-Segmenten. Je wiederholter eine Einheit in einer Sequenz ist, desto mehr Varianten sind zu erwarten. Andererseits läßt sich dieser Polymorphismus auch als ein zusätzlicher Beweis für die Inaktivität des Heterochromatins ansehen (Schwarzacher, 1976), denn trotz der großen Variabilität bestanden bei den von Craig et al. untersuchten Personen keine phänotypischen Abnormitäten.

Verschiedene Befunde legten einen Zusammenhang zwischen dem konstitutiven Heterochromatin und nucleolusorganisierenden Funktionen nahe. So wurden beim Menschen Kontakte von Nukleolen mit Chromosom Nr. 9 sowohl in der Meiose (Gagnê, Laberge und Tanguay, 1973; Gagnê, Luciani, Devietor-Vuillet und Stahl, 1974) als auch in somatischen Zellen (Gagnê, Laberge und Tanguay, 1972) beschrieben; bei M. agrestis ließen sich Nukleoluskontakte zu den großen Geschlechtschromosomen nachweisen (Natarajan und Sharma, 1971; Pera, 1972_b). Henderson, Warburton und Atwood (1972) fanden indes keinen Beweis für das Vorkommen von Genen für r-RNS

außerhalb der typischen Nukleolus-Organisator-Regionen der akrozentrischen Chromosomen. Dies schließt jedoch nicht aus, daß das konstitutive Heterochromatin zumindest während der Evolution eine Bedeutung für die Nukleolusbildung hat.

1.5. Funktion des konstitutiven Heterochromatins

Die hochrepetitive DNS des konstitutiven Heterochromatins wird als inaktive bzw. "trivial"-DNS angesehen. Nach Ohno (1972, 1974) hat sich die "trivial"-DNS während der Evolution durch Genduplikation akkumuliert. Bei der Entstehung eines bestimmten Gens durch Duplikation kommen zwei Möglichkeiten in Betracht: entweder wird ein neues, funktionierendes Gen erzeugt oder es wird wegen verschiedener Mutationen, die ihm nicht gestatten, ein sinnvolles Gen zu werden, degenerieren. Die letzte Möglichkeit kommt wahrscheinlich öfter vor, so daß ein große Menge von nicht funktionierender DNS angesammelt wird. Diese könnte als "Spacer" zwischen den Strukturgenen liegen und als Schutz gegen mutagene Einflüsse eine Rolle spielen. Da die "trivial"-DNS selbst genetisch inaktiv ist, können auch ihre Alterationen weitgehend folgenlos bleiben.

Southern (1971) konnte feststellen, daß die Sat-DNS eine große Anzahl von Mutationen toleriert, und sogar ganze Stückverluste von Heterochromatin-Segmenten die weitere Zellteilung und das Wachstum nicht beeinträchtigen. Nach Natarajan und Ahnström (1973) macht die Konzentration der Sat-DNS die Heterochromatin-Segmente empfänglicher für die Bildung von Aberrationen.

Über die Funktion des konstitutiven Heterochromatins gibt es viele Spekulationen (z. B. Walker, Flamm und Mc Laren, 1969; Britten und Kohne, 1968; Flamm, 1972; Yunis und Yasmineh, 1971). Manche sahen das konstitutive Heterochromatin als Abfall ("junk"), andere vermuten eine Beteiligung bei der Organisation der Spindel-Mikrobubuli, der Stabilisierung von Chromosomenenden und bei der Anziehung homologer Chromosomen in der Meiose. Yunis und Yasmineh (1971) deuteten das konstitutive Heterochromatin als Schutz von lebenswichtigen Organellen des Chromosoms, z. B. der

Kinetochoren und Nukleolus-organisierenden Regionen.

Hardy und Bryan (1974) fanden bei der Maus nach peroraler Cu-Cl-Gabe einen weit höheren Cu-Einbau im kondensierten als im dekondensierten Chromatin. Sandritter (1970) konnte eine erhönte Säureresistenz des Heterochromatins gegenüber dem Euchromatin feststellen und sah dies als Hinweis auf die Schutzfunktion des Heterochromatins für euchromatische Gene an.

Von Hsu (1975) stammt die "Bodyguard"-Hypothese, wonach das an der Kernperipherie liegende Heterochromatin eine Abschirmung gegen schädigende Einflüsse bilden, diese absorbieren und so das Euchromatin schützen könne. Hsu fand, daß Peromyscus-Zellen nach Behandlung mit Mitomycin C in isotonischer Lösung 91.5 % der Brüche im Heterochromatin und 8.5 % im Euchromatin zeigten. Dagegen waren bei Behandlung mit Mitomycin C in hypotonischer Lösung 36 % der Brüche im Heterochromatin und 64 % im Euchromatin lokalisiert. Elektronenmikroskopisch zeigte sich unter dem hypotonischen Stress eine Umorganisation des Chromosomenmaterials im Kern mit einer Auflockerung des peripher liegenden kondensierten Heterochromatins. So könnte nach Hsu durch die hypotonische Lösung die Barriere entfernt worden sein; Mutagene oder andere Carcinogene hätten jetzt eher die Möglichkeit, das diffus liegende Euchromatin zu schädigen.

Barranco und Humphrey (1971) und Dewey, Noel und Dettor (1972) beobachteten bei Zellen, die während der Mitose durch chemische Agenten behandelt oder bestrahlt worden waren, eine höhere Aberrationsfrequenz als bei Zellen, die während der Interphase behandelt worden waren. Hsu (1975) erklärte dieses Phänomen damit, daß während der Mitose und wahrscheinlich auch schon in der späteren G_2-Phase sowohl das konstitutive Heterochromatin als auch das Euchromatin sich zu den mitotischen Chromosomen umbilden, und so die "shilding capability" des Heterochromatins verschwindet oder zumindest reduziert wird. In diesen Stadien ist das Euchromatin "bare" (entblößt) und deshalb für Noxen stärker empfänglich als in der stärker geschützten G_1- und S-Phase.

2. Zeichen der Entartung der Zellen

2.1. Numerische Aberrationen

Pera (1970) beschrieb mehrere Möglichkeiten für eine Polyploidisierung, d. h. ganzzahlige Vervielfachung des haploiden Chromosomensatzes, in vivo und in vitro: abnorme Fertilisation, Kernfusion von Blastomeren in den ersten Furchungsstadien, Endomitose, Endoreduplikation, C-Mitose, Zellfusion, Zellkernfusionen, amitotische Teilung der Zellkerne ohne nachfolgende Cytokinese, mitotische Kernteilung ohne Zellteilung und multipolare Mitosen. Kutzner (1980) konnte in Lebendbeobachtungen bei M. agrestis-Fibroblasten multipolare Mitosen, Zellfusionen, Zellkernfusionen sowie ausbleibende Cytokinese nach bi- und multipolaren Zellteilungen als Entstehungsmechanismen polyploider Zellen nachweisen.

Als somatische Reduktion bezeichnete Ohno (1966) die Verringerung der Chromosomenzahl polyploider somatischer Zellen durch mehrpolige Kernteilungen, wie sie als Doppel-, Parallel- und multipolare Mitosen in polyploiden Zellpopulationen häufig zu beobachten sind (Pera, 1975).

Durch genauere Analysen von multipolaren M. agrestis-Mitosen und ihrer Tochterkerne fanden Pera und Schwarzacher (1969), Schwarzacher und Pera (1969), Pera (1970), Pera und Rainer (1973 und 1974) und Pera und Scholz (1974), daß durch multipolare Mitosen die Chromosomen nach vollständigen Chromosomensätzen geordnet auf mehrere Tochterkerne verteilt werden. Nach Pera und Rainer (1973) ist bei tetraploiden Zellen die tripolare Mitose mit dem Verteilungsmodus 3c : 3c : 2c häufig vertreten. Die Verteilung von vollständigen Chromosomensätzen in mehrpoligen Mitosen wurde auch bei Zellen von Rhesusaffen beschrieben (Palitti und Rizzoni, 1972; Rizzoni, Palitti und Perticone, 1974).

Kutzner (1980) beobachtete, daß in einer euploiden M. agrestis-Kultur nur 5.5 % der mehrpoligen Mitosen nicht zur nach "voll-

ständigen haploiden Chromosomensätzen geordneten Verteilung der genetischen Substanz" führten, während in einer aneuploiden Kultur 56.8 % der mehrpoligen Mitosen eine regellose Chromosomenverteilung zeigten. Ähnliche Befunde wurden von Palitti und Rizzoni (1972) beschrieben.

Als Ursache für die Entstehung aneuploider Zellen, die nicht mehr ein ganzzahliges Vielfaches des vollständigen haploiden Chromosomensatzes enthalten, kommen mehrere Möglichkeiten in Betracht: Translokationen von Autosomen, die zu Markerchromosomen führen; Liegenbleiben von Chromosomen während der Anaphase mit Mikrokernbildung in der Interphase und eventuellem Verlust in der nächsten Mitose; mitotisches Non-disjunction; regellose Verteilung bei mehrpoligen Mitosen (Pera, 1970; Galloway und Buckton, 1978; Kutzner, 1980).

In Langzeitkulturen v. a. von Nagerzellen besteht eine Tendenz zur Poly- und Aneuploidisierung. In der von Firsching (1976) untersuchten M. agrestis-Kultur war während der ersten 200 Tage eine relative scharfe Trennung zwischen diploid und polyploid zu beachten. Nach 219 Tagen wurden gehäuft Mitosen im triploiden Bereich gefunden, nach 259 Tagen war keine Bevorzugung einer bestimmten Ploidieklasse zu erkennen.

Die Änderung des Ploidiespektrums während der Kulturzeit auch in der in dieser Arbeit beschriebenen Kultur deutet auf immer wieder neu auftretende Polyploidisierungs-, Reduktions- und Aneuploidisierungsprozesse hin; diese verhindern das Entstehen chromosomal stabiler Stammlinien.

2.2. Morphologische Aberrationen

Die morphologischen Veränderungen der Chromosomen zeigten sich in Form von Markerchromosomen, die entweder durch Brüche, Deletionen, Translokationen oder durch Robertsonsche Translokationen entstanden waren. Schneider und Waldenmaier (1969) ermittelten nach Röntgenbestrahlung (250 R) von Fibroblastenkulturen von M. agrestis ein Bruchverhältnis zwischen Euchromatin und Hetero-

chromatin der Geschlechtschromosomen von 1 : 4.5 (weiblich) bzw. 1 : 5.7 (männlich). Die Bruchverteilung zeigte deutliche Maxima zu beiden Seiten des Centromers (proximaler Anteil) und der distalen 2/3 des langen Armes der X-Chromosomen. Eine damit gut übereinstimmende Bruchlokalisation beobachteten auch Natarajan und Sharma (1971) nach Markierung mit ^{3}H-Uridin. Pera (1969_{b}) fand in mehreren M. agrestis-Kulturen spontane Deletionen der Geschlechtschromosomen. Beim Weibchen betrug die Restlänge des deletierten langen X-Armes durchschnittlich 34 %, beim Männchen 30 % des langen Armes eines normalen X-Chromosoms. Weiterhin traten Translokationen des azentrischen heterochromatischen Fragments auf die langen Arme eines anderen X-Chromosomen auf, jedoch keine Translokation von Heterochromatin auf Euchromatin. Nach Röntgenbestrahlung von M.agrestis in vivo konnten Cooper und Hsu (1971) auch Translokationen von Heterochromatin auf Euchromatin feststellen.

Während die oben erwähnten strahleninduzierten Aberrationen 23 bzw. 42 Tage nach in vivo-oder in vitro-Bestrahlung zu beobachten waren, traten nach Röntgenbestrahlung von M. agrestis noch ein Jahr später in Knochenmarkszellen ähnliche Aberrationen auf (Cooper, 1977). Cooper fand mehr Translokationen der Geschlechtschromosomen als Deletionen und schloß daraus, daß das genetische Material in den bestrahlten Zellen mehr umverteilt als verloren worden wäre. Bei einer unbehandelten M. agrestis-Langzeitkultur sah Firsching (1976) dagegen mehr Deletionen als Translokationen. Sie stellte einen Verlust von 64 % an konstitutivem Heterochromatin fest. Cooper beobachtete in den meisten Fällen Translokationen des langen X-Arms auf ein Autosom oder auf den kurzen Arm eines X-Chromosoms (bei 500 R in 2.8 %). Er konnte bei einer Stammlinie auch Translokationen von kurzen Armen eines X auf ein Autosom feststellen. Dieser Befund entspräche unserem Markerchromosom "Z" und bedeutet, daß kein Verlust von aktivem X-Material eingetreten war. Auch bei völligem Verlust des langen X-Arms (Typ "E") bleibt dieses im kurzen Arm lokalisierte Material erhalten. Ähnliche Aberrationen wurden auch von Cooper, Arrighi und Hsu (1970) und Firsching (1976) mitgeteilt. Natarajan und Ahnström (1973) konnten bei M. agrestis sowohl Chromatidbrüche der Autosomen als auch

der Geschlechtschromosomen feststellen. Sie fanden mehr Isochromatidbrüche mit Schwesterreunionen als solche ohne Schwesterreunionen. Nur in seltenen Fällen beobachteten sie auch einen Chromosomenmaterialaustausch zwischen beiden X-Chromsomen.

Kerres (1979) untersuchte die Häufigkeit und Lokalisation von "Sister Chromatid Exchanges" (SCE) nach in vivo Behandlung mit BrdU und fand bei 3, 5 und 7 Zehntel der Längen sowohl des kurzen als auch des langen Arms der X-Chromosomen und des Y-Chromosoms eine erhöhte Austauschfrequenz. Die Maxima bei 3/10 des X-Heterochromatins und 5/10 des Y-Heterochromatins entsprechen den von Pera (1969_b) beschriebenen spontanen Deletionsstellen. Auch die bei 7/10 des X-Heterochromatins und 7/10 des Y-Heterochromatins beobachteten SCE's korrelieren mit den Befunden von Schneider und Waldenmaier (1969) und Natarajan und Sharma (1971). Diese Befunde zeigen einen Zusammenhang zwischen SCE's und Chromosomenaberrationen, doch laufen diese beiden Phänomene nicht immer parallel.

3. Zellentartung und Heterochromatisierung

Numerische und morphologische Veränderungen des Chromosomenkomplementes sind typische Merkmale entarteter Zellen (Levan und Hauschka, 1953; Hsu, 1954_a und 1954_b; Natarajan und Gropp, 1971 und Cooper, 1977). In vitro ist das maligne Wachstum der Zellen weder an das Vorherrschen einer bestimmten Chromosomenzahl noch an das Auftreten bestimmter Markerchromosomen gebunden (Firsching 1976).

Aus den cytogenetischen Befunden, die an der hier untersuchten Zellkultur erhoben werden konnten, ist abzuleiten, daß die entarteten Zellen nicht Tochterzellen einer einzelnen Zelle mit bestimmten Chromosomenveränderungen waren, sondern daß mehrere nebeneinander wachsende Stammlinien existierten, deren Chromosomenkomplement wiederum nur relativ kurze Zeit unverändert auf die Tochtergenerationen weitergegeben wurde. Insgesamt jedoch ging die Tendenz im Lauf der über vierjährigen Kulturzeit zu Heterochromatinverlust und Polyploidisierung. Ob die Zunahme des Heterochromatins durch Polyploidisierung und die Abnahme des

Heterochromatins durch Deletion miteinander und in ihren Folgen (Tumorwachstum, Malignität, etc.) zusammenhängen, ist aufgrund der bisher vorliegenden Daten nicht zu entscheiden.

Sandritter (1970) konnte bei der Maus nach Behandlung mit Thioacetatamid und Nitrosemorphilin eine zunehmende Heterochromatisierung in Leberzellkernen feststellen. Das Verhältnis von Euchromatin zu Heterochromatin änderte sich von 80 : 20 auf 60 : 40, d. h. es fand eine Zunahme des Heterochromatins auf Kosten des Euchromatinanteiles statt und zwar "bevor Tumoren in der Leber entstanden waren". Nach Harbers und Sandritter (1968) kann die Zunahme des Heterochromatins zwei verschiedene Folgen haben; entweder werden die elementaren Bedürfnisse der Zelle reduziert, was zum Zelltod führt; oder spezifische Leistungen werden eingeschränkt (z. B. Ausfall von Wachstumkontrollmechanismen), was zur Carcinogenese führen könnte.

Harbers und Sandritter sahen die Heterochromatisierung als "morphologisches Äquivalent eines Verlustes der verfügbaren Information der DNS". Dabei wurde die Heterochromatisierung als pathogenetisches Prinzip aufgefaßt. In einer späteren Arbeit (Harbers und Sandritter, 1973) schlossen die Autoren jedoch nicht aus, daß die Heterochromatisierung nur eine Folge pathologischer Zellprozesse und nicht deren Ursache sein könnte.

Diesen Befunden einer Heterochromatisierung, d. h. Zunahme des Heterochromatins im Zellkern, als Ursache oder auch Folge der Cancerogenese, scheinen die cytogenetischen Befunde von Firsching (1976) in einer männlichen, und die eigenen Beobachtungen an einer weiblichen M. agrestis-Kultur, wonach die Zellentartung mit einer Abnahme von Heterochromatin verknüpft ist, zunächst zu widersprechen. Auch andere Autoren waren der Meinung, daß auf zellulärer Ebene und vom Organismus ein Heterochromatinverlust besser als ein Euchromatinverlust überstanden wird (Swanson, 1960; Cooper, 1977).

Der Widerspruch rührt von der unterschiedlichen Verwendung des Heterochromatinbegriffes her: Heterochromatin gleich kondensiertes Interphasechromatin auf der einen Seite (durch höhere optische Dichte photometrisch mehr oder wenig deutlich vom "Euchromatin"

abgrenzbare Zellkernareale), und Heterochromatin gleich bestimmte Chromosomenabschnitte mit bestimmten Merkmalen (späte DNS-Replikation, genetische Inaktivität, repetitive DNS, spezielle Färbbarkeit usw.) auf der anderen.

Heterochromatisierung im Sinne Sandritters bedeutet eine Kondensation von Chromosomen im Interphasekern, die cytogenetisch nicht näher definierbar sind, aber infolge der Kondensation im Augenblick wohl genetisch inaktiv sind. Heterochromatinverlust, wie hier beschrieben, bedeutet das Fehlen bestimmter Chromosomenabschnitte, die soweit heute bekannt von vornherein genetisch inaktiv sind.

"Die Geschichte des Heterochromatins ist ein Lehrstück über den Fehler durch Unsauberkeit in der Wahl der Begriffe ständig aneinander vorbeizureden" (Pera, 1980).

ZUSAMMENFASSUNG

Während einer mehr als vierjährigen Langzeitbeobachtung einer Fibroblastenkultur einer weiblichen Erdmaus (Microtus agrestis) wurden Untersuchungen über die Ploidieveränderungen der Zellen und die Morphologie der Chromosomen durchgeführt.

Die Chromosomenzählung zeigte eine Änderung vom ursprünglich diploiden Satz (2n = 50) zu aneuploiden Zahlen. Die aneuploiden Zellen zeigten keine Bevorzugung einer bestimmten Ploidieklasse.

Während der aneuploiden Phase wurden in allen untersuchten Subkulturen morphologisch abweichende Markerchromosomen nachgewiesen. Sie stammten entweder von den Geschlechtschromosomen oder von fusionierten Autosomen. Die verschiedenen X-Markerchromosomen zeigten folgende Aberrationen: partielle oder totale Deletionen des langen Arms (am häufigsten), Translokation eines Autosoms auf einen deletierten langen Arm, Robertson'sche Translokationen von zwei kurzen Armen, Robertson'sche Translokation von zwei langen Armen, Translokation des kurzen Arms auf ein Autosom. Die einzelnen Markerchromosomen stammten nicht aus einer bestimmten Zelle, sondern entwickelten sich in mehreren, zu unterschiedlichen Zeitpunkten entstandenen Stammlinien.

In der Diskussion wird ein Überblick über den Aufbau, die genetische Aktivität und die Funktion des konstitutiven Heterochromatins gegeben. Die Möglichkeiten einer Zellentartung durch Chromatinverlust und Heterochromatisierung werden erörtert.

LITERATUR

1. ARRIGHI, F.E., HSU, T.C., SAUNDERS, P., SAUNDERS, G.F.:
Localisation of repetitive DNA in the chromosomes of Microtus agrestis, by means of in situ hybridization.
Chromosoma (Berl.) 32, 224-236 (1970)

2. ARRIGHI, F.E., SAUNDERS, G.F.:
The relationship between repetitious DNA and constitutive heterochromatin with special reference to man.
In: Modern Aspects of Cytogenetics: Constitutive Heterochromatin in Man. (R.A. Pfeiffer, ed.) Stuttgart - New York: Schattauer (1973)

3. BAHR, G.F., GOLOMB, H.M.:
Karyotyping of single chromosomes from dry mass determined by electron microscopy.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash) 68, 726-730 (1971)

4. BAHR, G.F., MIKEL, U., ENGLER, W.F.:
Correlates of chromosomal banding at the level of ultrastructure.
In: Novel Symposium 23, Chromosome identification-technique and applications in biology and medicine.
(T. Caspersson, L. Zech, eds.) London - New York: Academic-Press (1973)

5. BARRANCO, S.C., HUMPHREY, R.M.:
The effects of Bleomycin in survival and cell progression in chinese hamster cells in vitro.
Cancer Res. 31, 1218-1223 (1971)

6. BIRNSTIEL, M. SPEIRS, J., PURDOM, J., JONES, K., LOENING, U.E.:
Properties and composition of the isolated ribosomal DNA satellite of Xenopus laevis.
Nature (Lond.) 219, 454-463 (1968)

7. BRITTEN, R:J., KOHNE, D.E.:
Repeated seqüences in DNA.
Sceince 161, 529-540 (1968)

8. BRITTEN, R.J., SMITH, J.:
A bovine genome.
Carnegie Inst. Wash. Year Book 68, 378-386 (1969)

9. CLARK, R.J., FELSENFELD, G.:
Association of arginine-rich histones with G.C.-rich regions of DNA in chromatin.
Nature (Lond.) New Biol. 240, 226-229 (1972)

10. COOPER, J.E.K.:
Chromosomes and DNA of Microtus.
III. Heterochromatin rearrangements in M. agrestis bone marrow clones.
Chromosoma (Berl.) 62, 259-278 (1977)

11. COOPER, J.E.K., ARRIGHI, F.E., HSU, T.C.:
Deletions of the X-chromosomes in Microtus agrestis cells in vitro.
Cytogenetics 9, 468-484 (1970)

12. COOPER, J.E.K., HSU, T.C.:
Radiation-induced deletions and translocations of Microtus agrestis sex-chromosomes in vivo.
Exp. Cell Res. 67, 343-351 (1971)

13. COOPER, K.W.:
Cytogenetic analyses of major heterochromatic elements (especially Xh and Y) in Drosophila melanogaster, and the theory of "heterochromatin".
Chromosoma (Berl.) 10, 535-588 (1959)

14. COOPER, K.W., HSU, T.C.:
The C-band and G-band patterns of Microtus agrestis chromosomes.
Cytogenetics II, 295-304 (1972)

15. CRAIG-HOLMES, A.P., MOORE, F.B., SHAW, M.W.:
Polymorphism of human C-band heterochromatin.
I. Frequency of variants. Amer. J. hum. Genet. 25,
181-192 (1973)

16. DEWEY, W.C., NOEL, J.S., DETTOR, C.M.:
Changes in radiosensitivity and dispersion of chromatin
during the cell cycle of synchronous chinese hamster cells.
Radiation Res. 52: 373-394 (1972)

17. FIRSCHING, V.:
Verlust von heterochromatischen Chromosomenabschnitten in
einer aneuploiden Gewebekultur von Microtus agrestis.
Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades,
Universität Bonn, Bonn 1976

18. FLAMM, W.G.:
Highly repetitive sequences of DNA in chromosomes.
Inter. Rev. Cytol. 32, 1-51 (1972)

19. GAGNÉ, R., LABERGE, C., TANGUAY, R.:
Interphase association of human "Y-body" with nucleolus.
Johns Hopk. med. J. 130, 254-258 (1972)

20. GAGNÉ, R., LABERGE, C., TANGUAY, R.:
Aspect cytologique et localisation intranucléaire de
l'heterochromatine constitutive de chromosomes C 9 chez
l'homme.
Chromosoma (Berl.) 41, 159-166 (1973)

21. GAGNÉ, R., LUCIANI, J.M., DEVICTOR-VUILLET, M., STAHL, A.:
C9 heterochromatin during the first meiotic prophase of
human foetal oocyte.
Exp. Cell Res. 85, 111-116 (1974)

22. GALLOWAY, S.M., BUCKTON, K.E.:
Aneuploidy and ageing: Chromosome studies on a random sample
of the population using G-banding.
Cytogenet. Cell Genet. 20, 78-95 (1978)

23. HARBERS, E., SANDRITTER, W.:
Gesteigerte Heterochromatisierung als pathogenetisches Prinzip.
Dtsch. med. Wschr. 93, 269-271 (1968)

24. HARBERS, E., SANDRITTER, W.:
Aufbau und Funktion des Chromatins.
Klin. Wschr. 51, 631-643 (1973)

25. HARDY, K.J., BRYAN, S.E.:
The differential localization and uptake of copper in mouse chromatin. Supportive evidence for a functional role for heterochromatin.
(Zit. nach T.C. HSU, 1975)

26. HEITZ, E.:
Die Herkunft der Chromocentren. Dritter Beitrag zur Kenntnis der Beziehung zwischen Kernstruktur und qualitativer Verschiedenheit der Chromosomen in ihrer Längsrichtung.
Planta 18, 571-637 (1933)

27. HENDERSON, A.S., WARBURTON, D., ATWOOD, K.C.:
Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 69, 3394-3398 (1972)

28. HENNIG, W., WALKER, P.M.B.:
Variations in the DNA from two rodent families (Cricetidae and Muridae).
Nature (Lond.) 225, 915-919 (1970)

29. HSU, T.C.:
Mammalia chromosomes in vitro.
IV. Some human neoplasms.
J. Nat. Cancer Inst. 14, 905-933 (1954a)

30. HSU, T.C.:
Cytological studies on HeLa, a strain of human cervical carcinoma. I. Observations on mitosis and chromosomes.
Texas Rep. Biol. Med. 12, 833-846 (1954b)

31. HSU, T.C.:
A possible function of constitutive heterochromatin: The bodyguard hypothesis.
Genetics 79, 137-150 (1975)

32. JONES, K.W., PROSSER, U., CORNEO, G., GINELLI, E., BOBROW, M.:
Satellite DNA, constitutive heterochromatin, and human evolution.
In: Modern Aspects of Cytogentics: Constitutive heterochromatin in man. (R.A. Pfeiffer, ed.) Stuttgart - New York: Schattauer (1973)

33. KERRES, H.A.:
Schwesterchromatidaustausche und Zellzykluszeit der Knochenmarkszellen von Microtus agrestis, nach Markierung mit 5-Brom-2-desoxyuridin in vivo.
Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades, Universität Bonn, Bonn (1979)

34. KIT, S.:
Equilibrium sedimentation in density gradients of DNA preparations from animal tissues.
J. molec. Biol. 3, 711-716 (1961)

35. KUTZNER, H.:
Die multipolare Mitose, Lebendbeobachtungen und cytophotometrische Untersuchungen an mehrkernigen Zellen aus der Gewebekultur.
Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades, Universität Bonn, Bonn (1980)

36. LENG, M., FELSENFELD, G.:
The preferential interactions of polylysine and polyarginine with spedific base sequences in DNA.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 56, 1325-1332 (1966)

37. LEVAN, A., HAUSCHKA, T.S.:
Endomitotic reduplication mechanism in ascites tumors of the mouse.
J. nat. Cancer Inst. 14, 1-43 (1953)

38. LITTAU, V.C. BURDICK, C.J., ALLFREY, K.G., MIRSKY, A.E.:
The role of histones in the maintenance of chromatin structure.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 54, 1204-1212 (1965)

39. LYON, M.F.:
Gene action in the X-chromosome of the mouse (Mus musculus L.).
Nature (Lond.) 190, 372 (1961)

40. LYON, M.F.:
X-Chromosome inactivation and developmental patterns in mammals.
Biol. Rev. 47, 1-35 (1972)

41. MANDEL, M., MARMUR, J.:
Use of ultraviolet absorbance-temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA.
In: Methods in Enzymology, vol. 12 B (L. Grossmann, M. Moldave, eds.) p. 195-206. London - New York: Academic Press (1968)

42. Mc KAY, R.D.G.:
The mechanism of G and C banding in mammalian metaphase chromosomes.
Chromosoma (Berl.) 44, 1-14 (1973)

43. MÖLLER, H.J., PAINTER; T.S.:
The differentiation of the sex chromosomes of Drosophila into genetically active and inert regions.
Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-L. 62, 316-365 (1932)

44. MÖLLER, W., Rosenkranz, W.,:
Rapid banding technique for human and mammalian chromosmes.
Lancet, 898 (1972I)

45. NATARAJAN, A.T., GROPP, A.:
The meiotic behaviour of autosomal heterochromatic segments in Hedgehogs.
Chromosoma (Berl.) 35, 143-152 (1971)

46. NATARAJAN, A.T., SHARMA, R.P.:
Tritiated uridine induced chromosome aberrations in relation to heterochromatin and nucleolar organisation in Microtus agrestis L.
Chromosoma (Berl.) 34, 168-182 (1971)

47. NATARAJAN, A.T., AHNSTRØM, G.:
Induced chromosomal aberrations and heterochromatin.
In: Symposia Medica Hoechst: Modern Aspects of Cytogenetics: Constitutive Heterochromatin in Man (ed.: R.A. Pfeiffer) Stuttgart - New York: Schattauer p. 215-223 (1973)

48. OHNO, S.:
Cytologic and genetic evidence of somatic segregation in mammals, birds and fishes. In: Phenotypic expression in vitro. Vol. 2. Baltimore: Tissue Culture Ass., Williams and Wilkins (1966)

49. OHNO, S.:
So much "junk" DNA in our genome. In: Evolution of Genetic Systems, vol. 23 (H.H. Smith, ed.) Brookhaven Symposia, p. 366-370. New York: Gordon and Breach (1972)

50. OHNO, S.:
Protochordata, Cyclostomata and Pisces. In. Animal Cytogenetics, vol. 4 (B. John, H. Bauer, S. Brown, H. Layana, A. Levan, M. White, eds.), Chordata I. Berlin - Stuttgart: Borntraeger (1974)

51. PALITTI, F. RIZZONI, M.:
Pattern of DNA segregation in multipolar anatelophases of different ploidy in euploid and aneuploid mammalian cells cultivated in vitro.
Genetica 43, 130-147 (1972)

52. PERA, F.:
Dauer der DNS-Replikation von Eu- und Heterochromatin bei Microtus agrestis.
Chromosoma (Berl.) 25, 21-29 (1968)

53. PERA, F.:
Struktur und Position der heterochromatischen Chromosomen in Interphasekernen von Microtus agrestis.
Z. Zellforsch. 38, 421-436 (1969a)

54. PERA, F.:
Deletion und Translokation heterochromatischer Chromosomenabschnitte bei Microtus agrestis.
Humangenetik 8, 217-229 (1969b)

55. PERA, F.:
Über den Wechsel der Ploidie und das Verhalten heteroploider Zellen.
Habilitationsschrift Bonn 1970
Veröffentlicht unter dem Titel:
Mechanismen der Ploidisierung und der somatischen Reduktion.
Erg. Anat. Entwickl. Gesch. Springer-Verlag Berlin - Heidelberg - New York, Band 43, Heft 5, 1-112 (1970)

56. PERA, F.:
Pattern of repetitive DNA of the chromosomes of Microtus agrestis.
Chromosoma (Berl.) 36, 263-271 (1972a)

57. PERA, F.:
Heterochromatin, repetitive DNS und Nucleolen in Leberzellen von Microtus agrestis.
Histochemie 30, 82-96 (1972b)

58. PERA, F.:
Arrangement of spindle apparatus in mitoses of different ploidy.
Exp. Cell. 92, 419-427 (1975)

59. PERA, F.:
Chromatinstruktur im Interphasekern.
Verh. Anat. Ges. 74, 29-38 (1980)

60. PERA, F., RAINER, B.:
Studies of multipolar mitoses in euploid tissue cultures. I. Somatic reduction to exactly haploid and triploid chromosome sets.
Chromosoma (Berl.) 42, 71-86 (1973)

61. PERA, F., RAINER, B.:
Studies of multipolar mitoses in euploid tissue cultures. II. Somatic segregation of the sex chromosomes.
Chromosoma (Berl.) 46, 225-232 (1974)

62. PERA, F., SCHOLZ, P.:
Polyploidization in vitro: formation of predominantaly triploid cell population in an originally diploid tissue culture of Microtus agrestis.
Humangenetik 21, 17-26 (1974)

63. PERA, F., SCHWARZACHER, H.G:
Die Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellkerne multipolarer Mitosen in euploiden Gewebekulturen von Microtus agrestis.
Chromosoma (Berl.) 26, 337-354 (1969)

64. PERA, F., WOLF, U.:
DNS-Replikation u. Morphologie der X-Chromosomen während der Syntheseperiode bei Microtus agrestis.
Chromosoma (Berl.) 22, 378-389 (1967)

65. PERRY, P., WOLFF, S.:
New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids.
Nature (Lond.) 251, 156-158 (1974)

66. RIZZONI, M., PALITTI, F., PERTICONE, P.:
Euploid segregation through multipolar mitosis in mammalian cell culture. Identification of triploid, haploid, and segregation diploid cells in a diploid-euploid primary culture of Rhesus kidney cells.
Chromosoma (Berl.) 45, 151-162 (1974)

67. SANDRITTER, W.:
Funktionsstrukturen des Zellkerns. Eu- und Heterochromatin.
Med. Welt 1/70, 1-10 (1970)

68. SAUNDERS, G.F., HSU, T.C. GETZ, M.J., SIMES, E.L., ARRIGHI, F.E.:
Location of a human satellite DNA in human chromosomes.
Nature (Lond.) New Biol. 236, 244-246 (1972a)

69. SAUNDERS, G.F., SHIRAKAWA, S., SAUNDERS, P., ARRIGHI, F.E., HSU, T.C.:
Populations of repeated DNA sequences in the human genome.
J. molec. Biol. 63, 323-334 (1972b)

70. SCHMID, W.:
Heterochromatin in mammals.
Arch. Klaus-Stift. Vererb.-Forsch. 42, 1-60 (1967)

71. SCHMID, W., LEPPERT, M.F.:
Rates of DNA synthesis in heterochromatic and euchromatic segments of the chromosome complements of two rodents.
Cytogenetics 8, 125-135 (1969)

72. SCHMID, W., SMITH, D.W., THEILER, K. (Zürich):
Chromatinmuster in verschiedenen Zelltypen und Lokalisation von Heterochromatin auf Metaphasechromosomen bei Microtus agrestis, Mesocricetus auratus, Cavia cobaya und beim Menschen.
Arch. Klaus-Stift. Vererb.-Forsch. 40, 35-49 (1965)

73. SCHNEIDER, G., WALDENMAIER, C.:
Verteilung strahleninduzierter Brüche auf den Geschlechts-chromosomen von Microtus agrestis.
Humangenetik 8, 230-241 (1969)

74. SCHRADER, F.:
Experimental and cytological investigations of life-cycle of Gossiparia spuria (Coccoidae) and their bearing on the problem of haploidy in males.
Ztschr. f. wissensch. Zool. 134, 149-179 (1929)

75. SCHWARZACHER, H.G.:
Chromosomes in mitosis and interphase.
Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen I/3.
Springer-Verlag Berlin - Heidelberg - New York (1976)

76. SEABRIGHT, M.:
The use of proteolytic enzymes for the mapping of structural rearrangements in the chromosomes of man.
Chromosoma (Berl.) 36, 204-210 (1972)

77. SEHESTED, J.:
Giemsa "banding" in metaphase chromosomes after pretreatment with inactivated trypsin.
Hum. Genet. 19, 321-324 (1973)

78. SOUTHERN, E.M.:
Base sequence and evolution of guinea pig α- satellite DNA.
Nature (Lond.) 277, 794-798 (1970)

79. SOUTHERN, E.M.:
Effects of sequence divergence on the reassociation properties of repetitive DNAs.
Nature (New Biol.) 232, 82-83 (1971)

80. SWANSON, C.P.:
Cytologie und Cytogenetik.
Stuttgart: Fischer (1960)

81. WALKER, P.M.B., FLAMM, W.G., Mc LAREN, A.:
Highly repetitive DNA in rodents.
In: Handbook of Molecular Biology. Edited by Lima de Faria.
John Wiley and Sons. New York. p. 52-66 (1969)

82. WANG, H.C., FEDOROFF, S.:
Banding in human chromosomes treated with trypsin.
Nature (Lond.) New Biol. 235, 52-53 (1972)

83. WARING, M., BRITTEN, R.J.:
Nucleotide sequence repetition: a rapidly reassociating fraction of mouse DNA.
Science 154, 791-794 (1966)

84. WEISBLUM, B.:
Why centric regions of quinacrine treated mouse chromosomes show diminished fluorescence.
Nature (Lond.) 246, 150-151 (1973)

85. WEISBLUM, B., HASETH, P.L., De:
Quinacrine, a chromosome stain specific for deoxyadenylate-deoxythymidylate-rich regions in DNA.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 69, 629-632 (1972)

86. WOLF, U., FLINSPACH, G., BÖHM, R., OHNO, S.:
DNS-Replikationsmuster bei dem Riesen-Geschlechtschromosomen von Microtus agrestis.
Chromosoma (Berl.) 16, 609-617 (1965)

87. YASMINEH, W.G., YUNIS, J.J.:
Repetitive DNA of Microtus agrestis.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 580-587 (1971)

88. YUNIS, J.J., YASMINEH, W.G.:
Satellite DNA in constitutive heterochromatin of guinea pig.
Science 168, 263-265 (1970)

89. YUNIS, J.J., YASMINEH, W.G.:
Heterochromatin, Satellite DNA and cell function
Science 174, 1200-1209 (1971)

DANKSAGUNG

Es erscheint mir angebracht, nach Abschluß dieser Arbeit Herrn Prof. Dr. med. Franz Pera für die Überlassung des Themas, seiner abwartende Geduld und vor allem für seinen wertvollen Rat und seine aufopfernde Hilfe zu danken.

Ferner möchte ich mich bei Frau Gerda Bahr für ihre Bemühungen und Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit bedanken. Ein besonderer Dank gilt auch Frau Christa Henseler für ihre Hilfe bei der Fertigstellung des Manuskriptes.

Grundsätzlich möchte ich allen Mitarbeitern des Anatomischen Institutes der Universität Bonn meinen herzlichen Dank aussprechen. Insbesondere möchte ich ihre Kollegialität hervorheben.

Diese Arbeit wurde mit dankenswerter Unterstützung des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD) durchgeführt.

LEBENSLAUF

Ben-Zion Amster, geb. 03.11.1951 in Tel-Aviv, Israel

Eltern: Eliezer Amster und Irene Amster geb. Warschawski

Schulen:
- 1957 - 1965 Grundschule "Grätz" in Tel-Aviv
- 1965 - 1969 Städtische Mittelschule "D", (Richtung: mathematisch-physikalisch) in Tel-Aviv
- Juni 1969 Abitur in Tel-Aviv

Studium:
- 1973 - 1979 Medizinstudium an der Universität Bonn
- 1975 Physikum in Bonn
- 1975 - 1979 Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD)
- 1976 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 1978 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 1978 - 1979 Praktisches Jahr an der Universität Bonn, Wahlfach: Zahn-, Mund-, Gesichts- und Kieferchirurgie

Beruf:
- 1979 Approbation als Arzt
- 01.07.79 - 31.03.80 HNO-Fachausbildung bei Prof. Dr. med. R. Maurer, HNO-Abteilung, Evang. Krankenhaus, Bonn-Bad Godesberg
- seit 01.04.80 bei Herrn Dr. P. H. Sauer, HNO-Facharzt, Bonn